DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.13.006
文章编号：1005-8982（2024）13-0041-08

实验研究·论著

基于MAPK/ERK通路探讨茯苓多糖对卵巢早衰模型大鼠的作用及其分子机制*

张静[1]，高冬冬[2]，谷灿灿[3]，胡国华[3]
（1.黄淮学院，河南 驻马店 463000；2.驻马店市中心医院 肿瘤科，河南 驻马店 463003；
3. 上海市中医医院 妇科，上海 200071）

摘要：目的 基于丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶（MAPK/ERK）通路探讨茯苓多糖对卵巢早衰（POF）模型大鼠的作用及其分子机制。**方法** 取50只SD雌性大鼠腹腔注射环磷酰胺诱导复制POF模型，随机分为5组：模型组、茯苓多糖低剂量组（100 mg/kg）、茯苓多糖高剂量组（200 mg/kg）、茴香霉素组（MAPK激活剂，10 mg/kg）、茯苓多糖高剂量+茴香霉素组，每组10只；另取10只SD雌性大鼠腹腔注射等剂量生理盐水作为对照组。分组处理后分别测定各组大鼠子宫指数及卵巢指数；酶联免疫吸附试验（ELISA）测定各组大鼠血清性激素[雌二醇（E_2）、促黄体生成素（LH）、卵泡刺激素（FSH）]水平；HE染色观察各组大鼠卵巢形态；酶联免疫吸附试验检测各组大鼠血清及卵巢组织肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素-4（IL-4）、白细胞介素-18（IL-18）水平；Western blotting检测各组大鼠卵巢组织MAPK/ERK通路相关蛋白表达。**结果** 与对照组比较，模型组大鼠卵巢间质结构有一定程度的出血和纤维化损伤，卵泡发育失常，血清FSH和LH水平、血清和卵巢组织TNF-α、IL-4、IL-18水平、卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK及p-ERK1/2/ERK1/2相对表达量均升高（$P<0.05$），子宫指数和卵巢指数、E_2水平均降低（$P<0.05$）。与模型组比较，茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组大鼠卵巢形态损伤及卵泡发育失常均减轻，血清FSH及LH水平、血清和卵巢组织TNF-α、IL-4、IL-18水平、卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK及p-ERK1/2/ERK1/2相对表达量均降低（$P<0.05$），子宫指数和卵巢指数、E_2水平均升高（$P<0.05$），且茯苓多糖高剂量组效果更优（$P<0.05$）。茴香霉素组大鼠卵巢形态损伤及卵泡发育失常加重，血清FSH及LH水平、血清和卵巢组织TNF-α、IL-4、IL-18水平、卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK及p-ERK1/2/ERK1/2相对表达量均升高（$P<0.05$），子宫指数及卵巢指数、E_2水平均降低（$P<0.05$）。茯苓多糖高剂量+茴香霉素组逆转茯苓多糖作用，呈相反趋势（$P<0.05$）。**结论** 茯苓多糖可通过抑制MAPK/ERK通路的激活减轻POF大鼠炎症，从而改善其卵巢功能和性激素分泌，缓解大鼠POF症状。

关键词： 卵巢早衰；丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶；茯苓多糖；分子机制
中图分类号： R711.75　　**文献标识码：** A

Study on the effect and molecular mechanism of Poria cocos polysaccharide on premature ovarian failure model rats based on MAPK/ERK pathway*

Zhang Jing[1], Gao Dong-dong[2], Gu Can-can[3], Hu Guo-hua[3]
(1. Huanghuai University, Zhumadian, Henan 463000, China; 2. Department of Oncology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan 463003, China; 3. Department of Gynecology, Shanghai Traditional Chinese Medicine Hospital, Shanghai 200071, China)

收稿日期：2023-12-25
* 基金项目：上海市2020年度“科技创新行动计划”医学创新研究专项项目（No：20Z21900400）
[通信作者] 胡国华，E-mail：hgh0083@163.com；Tel：13817813957

Abstract: Objective To explore the effect and molecular mechanism of Poria cocos polysaccharide on premature ovarian failure (POF) model rats based on mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular regulated protein kinase (ERK) pathway. **Methods** The POF model was induced by intraperitoneal injection of cyclophosphamide in SD female rats, and was randomly divided into five groups: model group, low dose poria cocos polysaccharide (100 mg/kg) group, high dose poria cocos polysaccharide (200 mg/kg) group, anisomycin (MAPK activator, 10 mg/kg) group, high dose poria cocos polysaccharide + anisomycin group, with 10 rats in each group, another 10 SD rats were injected intraperitoneally with the same dose of normal saline as the control group, the uterus index and ovary index of rats in each group were measured after treatment with Poria cocos polysaccharide and anisomycin; the levels of serum sex hormones [estradiol (E_2), luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH)] were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit; the ovarian morphology of rats in each group was observed by HE staining; the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-4 (IL-4) and IL - 18 in serum and ovarian tissue of rats in each group were measured by ELISA kit; the expression of MAPK/ERK pathway related protein in ovarian tissue of rats in each group was detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the interstitial structure of the ovary in the model group had some degree of hemorrhage, fibrosis damage, and follicular dysplasia, the serum FSH and LH levels, serum and ovarian tissue TNF-α, IL-4, IL-18 levels, ovarian tissue p-p38 MAPK/p38 MAPK and p-ERK1/2/ERK1/2 were increased ($P < 0.05$), the uterine index, ovarian index and E_2 level were decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the ovarian morphology damage and follicular dysplasia of rats in the low dose group and the high dose Poria cocos polysaccharide group were alleviated, the serum FSH and LH levels, serum and ovarian tissue TNF-α, IL-4, IL-18 levels, ovarian tissue p-p38 MAPK/p38 MAPK and p-ERK1/2/ERK1/2 were all decreased ($P < 0.05$), uterine index, ovarian index and E_2 level were increased ($P < 0.05$), and the effect of pachyman high dose group was better ($P < 0.05$); In the anisomycin group, the ovarian morphology damage and follicular dysplasia were aggravated, the levels of serum FSH and LH, serum and ovarian tissue TNF-α, IL-4, IL-18, and ovarian tissue p-p38 MAPK/p38 MAPK and p-ERK1/2/ERK1/2 were increased ($P < 0.05$), uterine index, ovarian index and E2 level decreased ($P < 0.05$). The high dose of pachyman+anisomycin group reversed the effect of pachyman, showing an opposite trend ($P < 0.05$). **Conclusion** Poria cocos polysaccharide can alleviate the inflammation of POF rats by inhibiting the activation of MAPK/ERK pathway, thereby improving the ovarian function and sex hormone secretion, and alleviating the symptoms of premature ovarian failure in rats.

Keywords: premature ovarian failure; mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated protein kinases; poria cocos polysaccharide; molecular mechanism

卵巢早衰（premature ovarian failure, POF）是发生在<40岁女性的一种常见妇科疾病，以雌激素减少、促性腺激素增多、卵巢功能衰竭为主要特性，患者表现为闭经、乳房萎缩、潮热、骨质疏松等临床症状，甚至会导致女性不孕，给患者心理上带来巨大压力[1-2]。炎症细胞因子在POF中扮演着重要角色，其引发的炎症参与卵巢储备功能下降及卵泡发育异常过程，抗炎处理可抑制卵泡闭锁并修复POF引发的卵巢功能[3-4]。有研究报道，丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）/细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinases, ERK）可通过调控炎症细胞因子的产生介导炎症反应，激活MAPK/ERK信号通路可促进炎症因子的产生[5]，并参与多囊卵巢综合征小鼠的高水平炎症、排卵功能障碍及黄体酮缺乏过程[6]。降低MAPK/ERK通路蛋白磷酸化水平可抑制氧化应激，进而减轻高脂高糖饮食诱导的POF症状[7]。因此，MAPK/ERK可作为潜在的POF治疗靶点。茯苓多糖是茯苓的主要活性成分，具有抗炎、调节免疫、抗氧化等生物活性[8]。有研究报道，茯苓多糖可通过减少炎症因子的生成，从而减轻心肌梗死大鼠心肌组织炎症损伤[9]，还可抑制MAPK通路激活，进而减轻2型糖尿病氧化应激，缓解其胰岛素抵抗[10]。因此推测茯苓多糖可能通过调控MAPK/ERK通路介导POF病理过程。本文基于MAPK/ERK通路探讨茯苓多糖对POF模型大鼠的作用及其分子机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物

SD 雌性大鼠，SPF 级，体重 205 ~ 230 g，7~8 周龄，由华中科技大学动物实验中心提供，喂养于上海市中医医院动物房饲养笼中，每笼不超过 4 只，温度 23 ~ 25 ℃，湿度 50% ~ 60%，每小时通风换气（10 ± 2）次，明暗各 12 h，并维持交替循环。实验动物生产许可证号：SCXK（鄂）2021–0009；实验动物使用许可证号：SYXK（沪）2020–0014。本实验经实验动物伦理委员会审核批准，并符合 3R（减量化、再利用、再循环）原则。

1.2　试剂与仪器

茯苓多糖（纯度：UV ≥ 90%，货号：SP8930）、环磷酰胺（货号：YZ–100234）、茴香霉素（纯度：HPLC ≥ 98%，货号：IA0770）均购自北京索莱宝科技有限公司，大鼠卵泡刺激素（follicle–stimulating hormone, FSH）酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）试剂盒（货号：D731057）、HE 染色试剂盒（货号：E607318）、大鼠促黄体生成素（luteinizing hormone, LH）ELISA 试剂盒（货号：D731015）、大鼠雌二醇（Estradiol, E_2）ELISA 试剂盒（货号：D741007）、大鼠肿瘤坏死因子 – α（tumor necrosis factor– α, TNF– α）ELISA 试剂盒（货号：D731168）均购自上海生工生物工程股份有限公司，兔抗大鼠 Anti–GAPDH（货号：ab181602）抗体、大鼠白细胞介素 –4（Interleukin, IL–4）ELISA 试剂盒（货号：ab100770）、HRP 偶联山羊抗兔二抗（货号：ab205718）、大鼠白细胞介素 –18（Interleukin, IL–18）ELISA 试剂盒（货号：AF1051）、兔抗大鼠 p38 MAPK 一抗（货号：AF7668）、BCA 蛋白浓度定量试剂盒（货号：P0011）、兔抗大鼠 p–ERK1/2 一抗（货号：AF5818）、兔抗大鼠 p–p38 MAPK 一抗（货号：AF5884）均购自上海碧云天生物技术有限公司。自动酶标仪（型号：Spectra MAX 190）购自美国 Molecular Devices 公司，生物光学显微镜（型号：DM LB2）、病理切片机（型号：RM2035）均购自德国 LEICA 公司，双稳电泳仪电源（型号：DYY–6C）、双垂直蛋白电泳仪（型号：DYCZ–24DN）、转印蛋白电泳仪（型号：DYCZ–40A）均购自上海双旭电子有限公司，凝胶成像仪（型号：Aliance Q9）购自英国 UVltec 公司。

1.3　方法

1.3.1　POF 模型大鼠复制及分组给药处理

参照文献[11]的方法复制 POF 模型大鼠：于 SD 雌性大鼠腹腔内注入用生理盐水溶解的环磷酰胺溶液 60 mg/kg 1 次，24 h 后再次注入环磷酰胺溶液 10 mg/kg，1 次/d，连续注射 14 d 即完成模型复制。通过阴道分泌物涂片观察大鼠动情周期，若发生动情周期延长或紊乱即表示 POF 模型复制成功。本实验共成功复制 POF 模型大鼠 50 只。随机分为 5 组：模型组、茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组、茴香霉素组、茯苓多糖高剂量+茴香霉素组，每组 10 只，另取 10 只 SD 雌性大鼠，以同样方法腹腔注射等剂量生理盐水作为对照组。模型复制成功后 24 h 进行分组给药：茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组大鼠分别灌胃 100 mg/kg、200 mg/kg 茯苓多糖（方法：将茯苓多糖溶于生理盐水中分别配制成 10 mg/mL、20 mg/mL 的药液，灌胃 10 mL/kg，1 次/d）[10]，同时腹腔注射 10 mL/kg 生理盐水（1 次/周）；茴香霉素组大鼠灌胃 10 mL/kg 生理盐水（1 次/d），同时腹腔注射 10 mg/kg 茴香霉素（方法：将茴香霉素溶于生理盐水中配制成 1 mg/mL 的药液，腹腔注射 10 mL /kg，1 次/周）[12]；茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠灌胃 200 mg/kg 茯苓多糖（方法：将茯苓多糖和茴香霉素溶于生理盐水中配制成 20 mg/mL 的药液，灌胃 10 mL /kg，1 次/d），同时腹腔注射 10 mg/kg 茴香霉素（方法：将茴香霉素溶于生理盐水中配制成 1 mg/mL 的药液，腹腔注射 10 mL/kg，1 次/周）；模型组、对照组大鼠灌胃 10 mL/kg 生理盐水（1 次/d），同时腹腔注射 10 mL/kg 生理盐水（1 次/周）。各组大鼠均连续给药 3 周。

1.3.2　测定各组大鼠子宫指数及卵巢指数、性激素水平并采集标本

3 周给药完全结束后 24 h 称量各组大鼠的体重，然后用乙醚气体进行麻醉，用注射器采集大鼠尾静脉血液，4 ℃、2 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液，用 ELISA 试剂盒检测 E_2、LH、FSH 水平，严格按照试剂盒说明书操作；以同样方法再次取适量血液离心获得血清，存于 –80 ℃备用。将各组大鼠颈椎脱臼处死并开腹，分别取出子宫和卵巢称重，根据公式计算子宫与卵巢指数[子宫与卵巢指数=子宫与卵巢重量（mg）/大鼠体重（g）× 100]。从各组大鼠卵巢上剪下适量卵巢组织，每只大鼠精确

称量0.3 g剪碎后加入生理盐水研磨，4 ℃、3 000 r/min离心 20 min，吸取上清液，存于-80 ℃备用；再次剪下卵巢组织约0.4 g存在液氮中备用；剩余的各组卵巢组织浸入4%多聚甲醛溶液中孵育固定，采用80%、90%、95%、100%的乙醇溶液梯度脱水，用热石蜡浸没包埋，石蜡组织块冷却后固定在切片机中进行连续切片，获得卵巢组织薄片备用（厚约5 μm）。

1.3.3　HE染色法观察各组大鼠卵巢形态　将1.3.2中大鼠卵巢组织切片取出置于二甲苯中浸泡脱蜡，采用100%、95%、90%、75%乙醇溶液梯度浸泡进行水化，孵育后进行HE染色，具体操作步骤严格按照HE染色试剂盒说明书进行，漂洗后在生物光学显微镜下观察各组大鼠卵巢形态并摄制其图像。

1.3.4　ELISA检测大鼠血清和卵巢组织炎症因子TNF-α、IL-4、IL-18水平　将1.3.2中大鼠血清和卵巢组织样本取出放入冰水浴中解冻，采用ELISA分别检测各组大鼠血清和卵巢组织炎症因子TNF-α、IL-4、IL-18水平，具体操作步骤严格按照ELISA试剂盒说明书进行。

1.3.5　Western blotting检测大鼠卵巢组织MAPK/ERK通路相关蛋白表达　将1.3.2中存于液氮的大鼠卵巢组织剪碎，加入适量RAPI裂解液研磨，4 ℃、3 000 r/min离心20 min，取上清液，采用BCA法测出其总蛋白浓度，以沸水浴孵育变性蛋白后每组取20 μg通过电泳分离开，采用湿转将其电转至PVDF膜上，以5%牛血清白蛋白溶液封闭后剪下p-p38 MAPK、p38 MAPK、p-ERK1/2、ERK1/2、GAPDH蛋白，孵育对应一抗及二抗溶液，洗膜后滴加化学发光试剂对各组蛋白条带进行显色，摄制其图像后运用Image J软件分析量化各蛋白相对表达。

1.4　统计学方法

数据分析采用SPSS 26.0统计软件。计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，比较用方差分析，进一步两两比较用SNK-q检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　茯苓多糖对大鼠子宫指数及卵巢指数的影响

对照组、模型组、茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组、茴香霉素组、茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠子宫指数和卵巢指数比较，经单因素方差分析，差异均有统计学意义（P<0.05）。进一步两两比较结果显示：与对照组比较，模型组大鼠子宫指数和卵巢指数均降低（P<0.05）；与模型组比较，茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组大鼠子宫指数和卵巢指数均升高（P<0.05）；茯苓多糖高剂量组大鼠子宫指数和卵巢指数较茯苓多糖低剂量组均升高（P<0.05）；与模型组比较，茴香霉素组大鼠子宫指数和卵巢指数均降低（P<0.05）；与茯苓多糖高剂量组比较，茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠子宫指数和卵巢指数均降低（P<0.05）。见表1。

表1　各组大鼠子宫指数和卵巢指数比较

（n=10，$\bar{x}\pm s$）

组别	子宫指数	卵巢指数
对照组	191.02±9.80	69.32±5.19
模型组	155.43±5.74①	48.41±2.21①
茯苓多糖低剂量组	172.56±6.93②	56.29±3.17②
茯苓多糖高剂量组	189.25±9.48②③	65.74±4.60②③
茴香霉素组	140.39±6.12②	41.18±2.15②
茯苓多糖高剂量+茴香霉素组	157.86±5.48④	50.93±3.04④
F值	72.676	89.341
P值	0.000	0.000

注：①与对照组比较，P<0.05；②与模型组比较，P<0.05；③与茯苓多糖低剂量组比较，P<0.05；④与茯苓多糖高剂量组比较，P<0.05。

2.2　茯苓多糖对大鼠血清性激素水平的影响

对照组、模型组、茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组、茴香霉素组和茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠血清性激素FSH、LH、E_2水平比较，经单因素方差分析，差异均有统计学意义（P<0.05）。进一步两两比较结果显示：与对照组比较，模型组大鼠血清FSH、LH水平均升高（P<0.05），E_2水平降低（P<0.05）；与模型组比较，茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组大鼠血清FSH、LH水平均降低（P<0.05），E_2水平均升高（P<0.05）；茯苓多糖高剂量组大鼠血清FSH、LH水平较茯苓多糖低剂量组均降低（P<0.05），E_2水平升高（P<0.05）；与模型组比较，茴香霉素组大鼠血清FSH、LH水平均升高（P<0.05），E_2水平降低（P<0.05）；与茯苓多糖高剂量组比较，茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠血清FSH、LH水平均升高（P<0.05），E_2水平降低（P<0.05）。见表2。

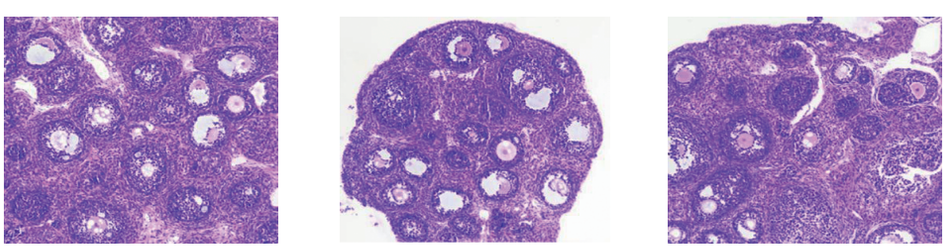
表 2　各组大鼠血清性激素水平的比较　（n=10，$\bar{x} \pm s$）

组别	FSH/（IU/L）	LH/（μg/L）	E_2/（pmol/L）
对照组	85.73 ± 6.17	71.38 ± 4.20	61.12 ± 4.83
模型组	115.29 ± 8.35①	93.85 ± 3.16①	44.86 ± 2.75①
茯苓多糖低剂量组	98.81 ± 6.92②	83.90 ± 3.42②	52.07 ± 3.64②
茯苓多糖高剂量组	86.02 ± 4.68②③	73.81 ± 3.04②③	59.95 ± 3.19②③
茴香霉素组	136.84 ± 10.76②	112.96 ± 4.67②	32.65 ± 2.60②
茯苓多糖高剂量 + 茴香霉素组	113.54 ± 7.95④	91.43 ± 3.23④	46.03 ± 2.47④
F值	65.830	172.756	101.517
P值	0.000	0.000	0.000

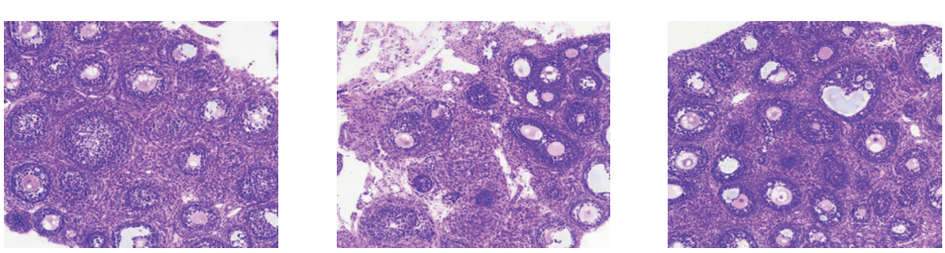
注：①与对照组比较，P<0.05；②与模型组比较，P<0.05；③与茯苓多糖低剂量组比较，P<0.05；④与茯苓多糖高剂量组比较，P<0.05。

2.3　茯苓多糖对大鼠卵巢形态的影响

对照组卵巢形态正常，内有不同发育阶段的卵泡。与对照组相比，模型组大鼠卵巢间质结构有一定程度的出血、纤维化损伤，卵泡发育失常（即内部缺乏处于不同发育阶段的卵泡且闭锁卵泡大量出现）；与模型组比较，茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组大鼠卵巢形态损伤均减轻，内部处于不同发育阶段的卵泡均有所恢复且闭锁卵泡均减少；茯苓多糖高剂量组大鼠卵巢形态损伤相比茯苓多糖低剂量组减轻，卵泡发育也恢复正常；与模型组比较，茴香霉素组大鼠卵巢形态损伤加重，卵泡发育失常加重；与茯苓多糖高剂量组相比，茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠卵巢形态损伤加重，卵泡发育失常加重。见图 1。



对照组　　模型组　　茯苓多糖低剂量组



茯苓多糖高剂量组　　茴香霉素组　　茯苓多糖高剂量+茴香霉素组

图 1　各组大鼠卵巢形态　（HE染色 × 200）

2.4　茯苓多糖对大鼠血清炎症因子水平的影响

对照组、模型组、茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组、茴香霉素组和茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠血清炎症因子TNF-α、IL-4、IL-18水平比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义（P < 0.05）。进一步两两比较结果显示：与对照组比较，模型组大鼠血清TNF-α、IL-4、IL-18水平均升高（P <0.05）。与模型组比较，茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组大鼠血清TNF-α、IL-4、IL-18水平均降低（P <0.05）；茯苓多糖高剂量组大鼠血清TNF-α、IL-4、IL-18水平较茯苓多糖低剂量组均降低（P < 0.05）；与模型组比较，茴香霉素组大鼠血清TNF-α、IL-4、IL-18水平均升高（P <0.05）；与茯苓多糖高剂量组比较，茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠血清TNF-α、IL-4、IL-18水平均升高（P <0.05）。见表3。

表 3　各组大鼠血清炎症因子 TNF-α、IL-4、IL-18 水平比较　（n=10，pg/mL，$\bar{x} \pm s$）

组别	TNF-α	IL-4	IL-18
对照组	235.17 ± 34.20	54.86 ± 8.03	75.82 ± 11.25
模型组	844.62 ± 64.78①	185.36 ± 23.62①	593.56 ± 39.68①
茯苓多糖低剂量组	536.74 ± 53.62②	123.95 ± 12.48②	338.92 ± 31.49②
茯苓多糖高剂量组	246.07 ± 40.12②③	61.20 ± 7.57②③	82.14 ± 13.45②③
茴香霉素组	1 431.54 ± 124.48②	312.97 ± 39.63②	982.63 ± 74.60②
茯苓多糖高剂量 + 茴香霉素组	827.37 ± 71.95④	172.45 ± 25.20④	580.10 ± 42.26④
F 值	401.025	181.162	714.197
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较，P<0.05；②与模型组比较，P<0.05；③与茯苓多糖低剂量组比较，P<0.05；④与茯苓多糖高剂量组比较，P<0.05。

2.5　茯苓多糖对大鼠卵巢组织炎症因子水平的影响

对照组、模型组、茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组、茴香霉素组和茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠卵巢组织炎症因子 TNF-α、IL-4、IL-18 水平比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义（P<0.05）。进一步两两比较结果显示：与对照组比较，模型组大鼠卵巢组织 TNF-α、IL-4、IL-18 水平升高（P<0.05）。与模型组比较，茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组大鼠卵巢组织 TNF-α、IL-4、IL-18 水平均降低（P<0.05）；茯苓多糖高剂量组大鼠卵巢组织 TNF-α、IL-4、IL-18 水平较茯苓多糖低剂量组均降低（P<0.05）；与模型组比较，茴香霉素组大鼠卵巢组织 TNF-α、IL-4、IL-18 水平均升高（P<0.05）；与茯苓多糖高剂量组比较，茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠卵巢组织 TNF-α、IL-4、IL-18 水平升高（P<0.05）。见表 4。

表 4　各组大鼠卵巢组织炎症因子 TNF-α、IL-4、IL-18 水平比较　（n=10，pg/mL，$\bar{x} \pm s$）

组别	TNF-α	IL-4	IL-18
对照组	413.72 ± 48.27	96.69 ± 11.30	158.24 ± 31.20
模型组	1 204.35 ± 88.75①	359.34 ± 38.65①	983.67 ± 73.62①
茯苓多糖低剂量组	816.43 ± 70.64②	228.96 ± 27.82②	564.93 ± 62.53②
茯苓多糖高剂量组	428.13 ± 56.19②③	109.25 ± 12.74②③	172.13 ± 48.46②③
茴香霉素组	1 672.56 ± 126.86②	608.74 ± 64.39②	1 763.82 ± 213.64②
茯苓多糖高剂量 + 茴香霉素组	1 187.30 ± 91.52④	346.18 ± 40.26④	965.91 ± 84.25④
F 值	342.094	264.241	338.656
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较，P<0.05；②与模型组比较，P<0.05；③与茯苓多糖低剂量组比较，P<0.05；④与茯苓多糖高剂量组比较，P<0.05。

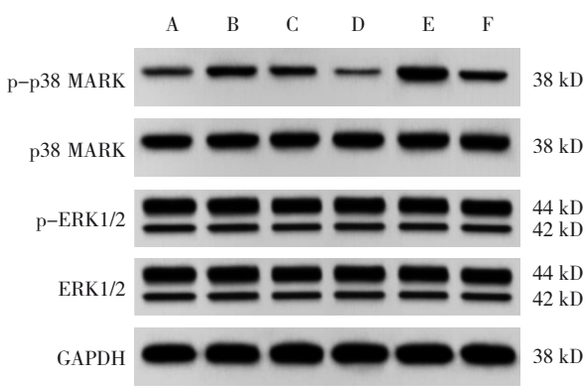
2.6　茯苓多糖对大鼠卵巢组织 MAPK/ERK 通路相关蛋白表达的影响

对照组、模型组、茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组、茴香霉素组和茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠卵巢组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 比较，经单因素方差分析，差异均有统计学意义（P<0.05）。进一步两两比较结果显示：与对照组比较，模型组大鼠卵巢组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 相对表达量升高（P<0.05）；与模型组比较，茯苓多糖低剂量组、茯苓多糖高剂量组大鼠卵巢组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 相对表达量均降低（P<0.05）；茯苓多糖高剂量组大鼠卵巢组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 相对表达量较茯苓多糖低剂量组降低（P<0.05）；与模型组比较，茴香霉素组大鼠卵巢组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 相对表达量均升高（P<0.05）；与茯苓多糖高剂量组比较，茯苓多糖高剂量+茴香霉素组大鼠卵巢组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 相对表达量均升高（P<0.05）。见表 5 和图 2。

表 5　各组大鼠卵巢组织MAPK/ERK通路相关蛋白相对表达量的比较　（n=10，$\bar{x} \pm s$）

组别	p-p38 MAPK/p38 MAPK	p-ERK1/2/ERK1/2
对照组	0.13 ± 0.02	0.09 ± 0.03
模型组	0.54 ± 0.06①	0.61 ± 0.07①
茯苓多糖低剂量组	0.34 ± 0.05②	0.35 ± 0.04②
茯苓多糖高剂量组	0.16 ± 0.03②③	0.11 ± 0.02②③
茴香霉素组	0.97 ± 0.03②	0.99 ± 0.01②
茯苓多糖高剂量+茴香霉素组	0.51 ± 0.07④	0.57 ± 0.08④
F值	436.621	492.364
P值	0.000	0.000

注：①与对照组比较，P<0.05；②与模型组比较，P<0.05；③与茯苓多糖低剂量组比较，P<0.05；④与茯苓多糖高剂量组比较，P<0.05。



A：对照组；B：模型组；C：茯苓多糖低剂量组；D：茯苓多糖高剂量组；E：茴香霉素组；F：茯苓多糖高剂量+茴香霉素组。

图2　各组大鼠卵巢组织MAPK/ERK通路相关蛋白表达

3　讨论

我国POF发病人数逐年上升，已成为亟须解决的问题。目前临床多选择激素替代治疗，该方法虽能缓解患者症状，但长期会产生很多毒副反应，并增加脑卒中、乳腺癌、胆囊炎等疾病的患病风险，因此基于更加安全的原则，探寻新型治疗药物至关重要[13-14]。本研究采用腹腔注射环磷酰胺的方法复制POF模型大鼠，实验结果显示，POF模型大鼠相比正常大鼠，血清FSH、LH水平，血清和卵巢组织TNF-α、IL-4、IL-18水平均升高，子宫指数和卵巢指数、E_2水平均降低，表明腹腔注射环磷酰胺可促使炎症因子大量产生，引发性激素分泌失衡，损伤卵巢及子宫形态，导致大鼠卵巢间质呈现一定程度的出血、纤维化损伤，卵泡发育失常等症状，揭示POF模型复制成功。

有研究发现，遗传因素、自身免疫异常等与POF发病密切相关，免疫细胞异常激活可促使大量促炎因子释放，通过诱发炎症引起卵巢颗粒细胞凋亡和卵巢功能衰竭等POF症状，抑制炎症是改善POF临床症状的有效手段[15-16]。茯苓作为一种具有宁心安神功效的传统食药同源药物，具有很高的安全性，其主要活性物质为茯苓多糖，对炎症有明显抑制作用[8]，可通过减轻氧化应激和炎症来延缓酒精性肝病的发展[17]。有报道称，茯苓还可有效减轻妊娠期糖尿病大鼠炎症与氧化应激损伤，并改善其糖脂代谢及胰岛素抵抗[18]，因而推测茯苓多糖可能通过其抗炎功效改善POF临床症状。本文以不同剂量茯苓多糖处理POF模型大鼠，结果显示茯苓多糖处理组大鼠相比模型组大鼠，血清FSH、LH水平，血清和卵巢组织TNF-α、IL-4、IL-18水平均降低，子宫指数和卵巢指数、E_2水平均升高，卵巢形态损伤及卵泡发育失常症状均减轻，表明茯苓多糖可降低促性腺激素及炎症因子水平，增强雌激素分泌，抑制炎症，改善性激素分泌平衡，修复卵巢功能，揭示茯苓多糖对临床POF治疗具有广泛应用前景。

MAPK/ERK作为机体调控炎症的重要信号通路在POF发生、发展中发挥关键作用[6-7]。MAPK/ERK途径传导可通过控制炎症和氧化应激，改善脂多糖诱导的新生小鼠急性呼吸窘迫综合征肺损伤症状[19]，促使MAPK信号失活可减轻γ辐射引发的卵巢组织损伤及卵巢颗粒细胞凋亡等POF症状，最终保护卵巢功能[20]。李乔等[10]研究证实，茯苓多糖可抑制MAPK通路激活，因而推测茯苓多糖治疗POF大鼠的分子机制可能是抑制MAPK/ERK通路激活。本研究结果显示，以MAPK激活剂茴香霉素处理POF模型大鼠，可促使炎症发展，进而加重大鼠卵巢功能及形态损伤，且茯苓多糖可降低POF大鼠卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK及p-ERK1/2/ERK1/2表达，表明MAPK/ERK通路参与POF发病及茯苓多糖对POF大鼠的治疗过程；以茯苓多糖和茴香霉素联合处理POF模型大鼠，相比茯苓多糖单独处理，可加重卵巢形态损伤及卵泡发育失常症状，提高大鼠血清FSH、LH水平，血清及卵巢组织TNF-α、IL-4、IL-18水平，降低其子宫指数及卵巢指数、E_2水平，表明茴香霉素可降低茯苓多糖的抗炎作用，消除其对POF大鼠性

激素分泌失衡及卵巢功能损伤的改善作用，最终逆转茯苓多糖对POF大鼠的治疗作用，揭示茯苓多糖改善POF模型大鼠症状是通过抑制MAPK激活实现的。

综上所述，茯苓多糖可降低MAPK与ERK的磷酸化水平，减少炎症细胞因子释放，通过阻止炎症发生、发展减轻POF大鼠症状，改善其性激素分泌并修复卵巢功能，抑制MAPK/ERK通路激活可能是其分子机制，本文证实了茯苓多糖可作为临床治疗POF的新型药物选择，对于维护女性生殖健康具有积极作用。

参 考 文 献：

[1] TEKGÖZ N, TAŞ D, ÇELIKEL E, et al. Premature ovarian failure in juvenile systemic lupus erythematosus patient: a rare presentation[J]. Lupus, 2022, 31(12): 1529-1531.

[2] LUO X, XU J J, ZHAO R, et al. The role of inactivated NF-κB in premature ovarian failure[J]. Am J Pathol, 2022, 192(3): 468-483.

[3] AKDEMIR Y, AKPOLAT M, ELMAS O, et al. Capsaicin prevents radiotherapy-induced premature ovarian failure in rats[J]. Reprod Fertil Dev, 2022, 34(3): 350-361.

[4] DENG T R, HE J, YAO Q Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve ovarian function in chemotherapy-induced premature ovarian failure mice through inhibiting apoptosis and inflammation via a paracrine mechanism[J]. Reprod Sci, 2021, 28(6): 1718-1732.

[5] WANG C, ZHANG S R, HUANG L A, et al. Chemerin promotes MAPK/ERK activation to induce inflammatory factor production in rat synoviocytes[J]. Exp Ther Med, 2022, 24(5): 684.

[6] GUO F, FERNANDO T, ZHU X Y, et al. The overexpression of neurokinin B-neurokinin 3 receptor system exerts direct effects on the ovary under PCOS-like conditions to interfere with mitochondrial function[J]. Am J Reprod Immunol, 2023, 89(3): e13663.

[7] LIU T, LIN J J, CHEN C, et al. MicroRNA-146b-5p overexpression attenuates premature ovarian failure in mice by inhibiting the Dab2ip/Ask1/p38-Mapk pathway and γH2A. X phosphorylation[J]. Cell Prolif, 2021, 54(1): e12954.

[8] 张熠璇, 蔡俊. 茯苓多糖的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(6): 215-224.

[9] 王琼, 赵明君, 董静, 等. 茯苓多糖通过NF-κB通路减轻心肌梗死大鼠组织损伤[J]. 重庆医学, 2022, 51(19): 3247-3252.

[10] 李乔, 张博. 茯苓多糖对2型糖尿病大鼠丝裂原激活的蛋白激酶通路及胰岛素抵抗的影响[J]. 安徽医药, 2022, 26(12): 2379-2382.

[11] 何毓婕, 曲涛, 王桐, 等. 松花粉对环磷酰胺致卵巢早衰大鼠的卵巢保护作用[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(6): 1005-1013.

[12] 郭俊玲, 吴曼, 李颖, 等. 基于MAPK/ERK信号通路探究延胡索乙素对心肌梗死后心力衰竭大鼠的心肌保护作用[J]. 中国药师, 2022, 25(5): 765-771.

[13] LIN L, GAO W J, CHEN Y M, et al. Reactive oxygen species-induced SIAH1 promotes granulosa cells' senescence in premature ovarian failure[J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(8): 2417-2427.

[14] ZIVARI-GHADER T, DOLATI S, MEHDIZADEH A, et al. Recent scaffold-based tissue engineering approaches in premature ovarian failure treatment[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2022, 16(7): 605-620.

[15] LI X N, LI X L, DENG L. Chrysin reduces inflammation and oxidative stress and improves ovarian function in D-gal-induced prematureovarianfailure[J].Bioengineered,2022,13(4):8291-8301.

[16] ZHAO Y T, YIN H W, HU C Y, et al. Tilapia skin peptides restore cyclophosphamide-induced premature ovarian failure via inhibiting oxidative stress and apoptosis in mice[J]. Food Funct, 2022, 13(3): 1668-1679.

[17] 姜悦航, 张越, 王妍妍, 等. 茯苓多糖提取物调控CYP2E1及NF-κB炎症通路改善小鼠酒精性肝病[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(1): 134-140.

[18] 杨娜, 肖颖, 刘静云. 茯苓多糖调控SIRT1/FOXO3a通路对妊娠糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2022, 30(8): 1371-1375.

[19] WANG X D, ZHANG C H, ZOU N, et al. Lipocalin-2 silencing suppresses inflammation and oxidative stress of acute respiratory distress syndrome by ferroptosis via inhibition of MAPK/ERK pathway in neonatal mice[J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 508-520.

[20] MANTAWY E M, SAID R S, KASSEM D H, et al. Novel molecular mechanisms underlying the ameliorative effect of N-acetyl-L-cysteine against ϒ-radiation-induced premature ovarian failure in rats[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 206: 111190.

（张西倩 编辑）

本文引用格式：张静, 高冬冬, 谷灿灿, 等. 基于MAPK/ERK通路探讨茯苓多糖对卵巢早衰模型大鼠的作用及其分子机制[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(13): 41-48.

Cite this article as: ZHANG J, GAO D D, GU C C, et al. Study on the effect and molecular mechanism of Poria cocos polysaccharide on premature ovarian failure model rats based on MAPK/ERK pathway[J]. China Journal of Modern Medicine, 2024, 34(13): 41-48.